

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C07K 7/23, A61K 38/09</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/55190</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. September 2000 (21.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02165		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, UZ, YU, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 11. März 2000 (11.03.00)			
(30) Prioritätsdaten: 199 11 771.3 17. März 1999 (17.03.99) DE			
(71) Anmelder: ASTA MEDICA AG [DE/DE]; An der Pikardie 10, D-01277 Dresden (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(72) Erfinder: BERNND, Michael; Günthersburgallee 52, D-60316 Frankfurt (DE). KUTSCHER, Bernhard; Stresemannstrasse 9, D-63477 Maintal (DE). GÜNTHER, Eckhard; Wingert- strasse 176, D-63477 Maintal (DE). ROMEIS, Peter; Mühlrainstrasse 16, D-63571 Gelnhausen (DE). REISS- MANN, Thomas; Massbornstrasse 44, D-60437 Frankfurt (DE). BECKERS, Thomas; Passavantstrasse 26, D-60596 Frankfurt (DE).			

**(54) Title:** NOVEL LHRH ANTAGONISTS WITH IMPROVED SOLUBILITY CHARACTERISTICS**(54) Bezeichnung:** NEUE LHRH-ANTAGONISTEN MIT VERBESSERTEN LÖSLICHKEITSEIGENSCHAFTEN**(57) Abstract**

The invention relates to peptides which contain N-methylated amino acid building blocks and are provided with improved water solubility. Medicaments containing the inventive peptides can be used for the treatment of hormone-dependent tumours and hormone-influenced, non-malignant diseases.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft Peptide, die N-methylierte Aminosäurebausteine enthalten und eine verbesserte Wasserlöslichkeit aufweisen. Arzneimittel, in denen die erfindungsgemäßen Peptide enthalten sind, können zur Behandlung hormonabhängiger Tumore und hormonbeeinflusster nicht-maligner Erkrankungen verwendet werden.

### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

## Neue LHRH-Antagonisten mit verbesserten Löslichkeitseigenschaften

Die Erfindung betrifft LHRH-Antagonisten mit verbesserten Löslichkeitseigenschaften, Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen, Arzneimittel, in denen diese Verbindungen enthalten sind, sowie die Verwendung der Arzneimittel zur Behandlung hormonabhängiger Tumore und hormonbeeinflußter nicht-maligner Erkrankungen wie benigner Prostatahyperplasie (BPH) und Endometriose.

Die zur Definierung der Peptide verwendete Nomenklatur stimmt mit jener durch die IUPAC-IUB-Kommission über Biochemische Nomenklatur erläuterten Nomenklatur überein (European J.Biochem. 1984, 138, 9-37), worin in Übereinstimmung mit der herkömmlichen Darstellung die Aminogruppen beim N-Terminus nach links erscheinen und die Carboxylgruppe beim C-Terminus nach rechts. Die LH-RH-Antagonisten wie die erfindungsgemäßen Peptide umfassen in der Natur vorkommende und synthetische Aminosäuren, wobei erstere Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp und His umfassen. Die Abkürzungen für die einzelnen Aminosäurereste beruhen auf den Trivialnamen der Aminosäuren und sind Ala=Alanin, Arg=Arginin, Gly=Glycin, Leu=Leucin, Lys=Lysin, Pal(3)=3-(3-Pyridyl)alanin, Nal(2)=3-(2-Naphthyl)alanin, Phe=Phenylalanin, Cpa=4-Chlorphenylalanin, Pro=Prolin, Ser=Serin, Thr=Threonin, Trp=Tryptophan, Tyr=Tyrosin und Sar=Sarkosin. Alle hier beschriebenen Aminosäuren stammen aus der L-Serie, wenn nicht anders erwähnt. Beispielsweise ist D-Nal(2) die Abkürzung für 3-(2-Naphthyl)-D-Alanin und Ser die Abkürzung für L-Serin. Substitutionen an der  $\epsilon$ -Aminogruppe in der Seitenkette von Lysin sind durch einen hinter Lys in Klammern gesetzten Ausdruck, gegebenenfalls in Form einer Abkürzung, dargestellt.

Andere verwendete Abkürzungen sind:

Ac Acetyl

Atz 3-Amino-1,2,4-triazol-5-carbonyl

B	4-(4-Amidino-phenyl)-amino-1,4-dioxo-butyl
Boc	tert. Butyloxycarbonyl
Bop	Benzotriazol-1-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Ddz	Dimethoxyphenyl-dimethylmethylenoxy-carbonyl (Dimethoxy-dimethyl-Z)
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
HF	Flußsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Me	Methyl
TFA	Trifluoressigsäure
Z	Benzoyloxycarbonyl

Die erfindungsgemäßen Peptide stellen Analoge des das luteinisierende Hormon freisetzenden Hormons (LH-RH) dar, das die folgende Struktur aufweist:

p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, [LH-RH, Gonadorelin].

Während mehr als 20 Jahren haben Forscher nach selektiv potenteren Antagonisten des LH-RH-Dekapeptids [M. Karten und J. E. Rivier, Endocrine Reviews 7, 44-66 (1986)] gesucht. Das hohe Interesse an solchen Antagonisten ist in ihrer Nützlichkeit im Bereich der Endokrinologie, Gynäkologie, Schwangerschaftsverhütung und Krebs begründet. Eine große Anzahl von Verbindungen sind als potentielle LH-RH-Antagonisten hergestellt worden. Die interessantesten Verbindungen, die bis heute gefunden wurden,

sind jene Verbindungen, deren Strukturen eine Modifizierung der LH-RH-Struktur darstellen.

Die erste Serie von potennten Antagonisten wurde durch die Einführung von aromatischen Aminosäureresten in den Positionen 1, 2, 3 und 6 oder 2, 3 und 6 erhalten. Die übliche Schreibweise der Verbindungen sieht wie folgt aus: Es werden zunächst die Aminosäuren angegeben, die in der Peptidkette von LH-RH an die Stelle der ursprünglich vorhandenen Aminosäuren getreten sind, wobei die Positionen, an denen der Austausch stattfand, durch hochgestellte Ziffern gekennzeichnet werden. Weiterhin wird durch die nachgestellte Bezeichnung "LH-RH" zum Ausdruck gebracht, daß es sich um LH-RH-Analoga handelt, an denen der Austausch stattfand.

Bekannte Antagonisten sind:

[Ac-D-Cpa<sup>1,2</sup>, D-Trp<sup>3,6</sup>] LH-RH (D.H.Coy et al., In: Gross, E. and Meienhofer, J. (Eds) Peptides; Proceedings of the 6th American Peptid Symposium, S.775-779, Pierce Chem.Co., Rockville III. (1979):

[Ac-Pro<sup>1</sup>, D-Cpa<sup>2</sup>, D-Nal(2)<sup>3,6</sup>] LH-RH (US-Patent Nr. 4.419.347) und

[Ac- Pro<sup>1</sup>, D-Cpa<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3,6</sup>] LH-RH (J.L.Pineda, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 56, 420, 1983).

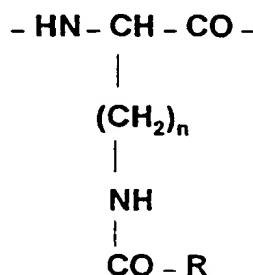
Um die Wirkung von Antagonisten zu verbessern, wurden später basische Aminosäuren, zum Beispiel D-Arg, in der 6-Stellung eingeführt. Zum Beispiel [Ac-D-Cpa<sup>1,2</sup>, D-Trp<sup>3</sup>, D-Arg<sup>6</sup>, D-Ala<sup>10</sup>] LH-RH (ORG-30276) (D.H.Coy, et al., Endocrinology 100, 1445, 1982); und

[Ac-D-Nal(2)1, D-Phe(4-F)<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3</sup>, D-Arg<sup>6</sup>] LH-RH (ORF 18260) (J.E. Rivier et al., in: Vickery B.H. Nestor, Jr. J.J., Hafez, E.S.E (Eds). LHRH and its Analogs, S.11-22 MTP Press, Lancaster, UK 1984).

Weitere potente LH-RH-Antagonisten sind in WO 92/19651, WO 94/19370, WO 92/17025, WO 94/14841, WO 94/13313, US-A 5,300,492, US-A 5,140,009, EP 0 413 209 A1 und DE 195 44 212 A1 beschreiben.

Letztere offenbart Verbindungen mit einem modifizierten Ornithin- oder Lysin-Baustein in Position 6, welche der folgenden Formel entsprechen:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-D-Xxx<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>,  
worin D-Xxx eine Aminosäuregruppe der allgemeinen Formel (VI)



darstellt.

Weitere bekannte LH-RH-Antagonisten sind Antarelix, Ganirelix und Cetrorelix.

Antarelix:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>

Ganirelix:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-D-hArg(Et)<sub>2</sub><sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-hArg(Et)<sub>2</sub><sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>

Cetrorelix:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup>-D-Cit<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>

Ziel der Erfindung ist, neue LH-RH-Antagonisten zu schaffen, die eine erhöhte enzymatische Stabilität und signifikant verbesserte Wasserlöslichkeit aufweisen.

Diese Aufgabe wird durch Verbindungen der folgenden allgemeinen Formel (I) gelöst,



worin

A eine Acetyl- oder eine 3-(4-Fluorphenyl)-propionyl-Gruppe,

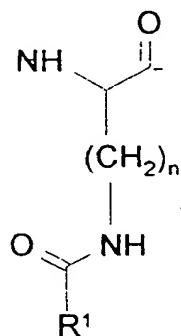
Xxx<sup>1</sup> D-Nal(1) oder D-Nal(2),

Xxx<sup>2</sup>-Xxx<sup>3</sup> D-Cpa-D-Pal(3) oder eine Einfachbindung,

Xxx<sup>4</sup> Ser,

Xxx<sup>5</sup> N-Me-Tyr,

Xxx<sup>6</sup> D-Cit, D-Hci oder eine D-Aminosäuregruppe der allgemeinen Formel (II)

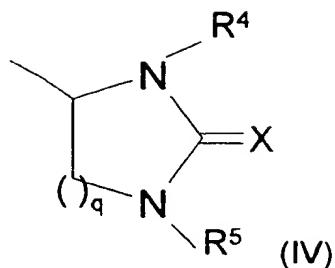


(II)

in der n die Zahl 3 oder 4 bedeutet, darstellt, wobei R<sup>1</sup> eine Gruppe mit der allgemeinen Formel III,



worin p eine ganze Zahl von 1 bis 4, R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Alkylgruppe und R<sup>3</sup> eine unsubstituierte oder substituierte Arylgruppe oder Heteroarylgruppe bedeutet, oder R<sup>1</sup> eine 3-Amino-1,2,4-triazol-5-carbonyl-Gruppe oder R<sup>1</sup> einen Ring der allgemeinen Formel (IV)



in dem q die Zahl 1 oder 2, R<sup>4</sup> ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe, R<sup>5</sup> ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe und X ein Sauerstoff- oder Schwefelatom bedeutet, darstellt,

Xxx<sup>7</sup> Leu oder Nle,

Xxx<sup>8</sup> Arg oder Lys(iPr),

Xxx<sup>9</sup> Pro und

Xxx<sup>10</sup> Ala oder Sar bedeutet,

und deren Salze mit pharmazeutisch akzeptablen Säuren, insbesondere die Acetate, Embonate und Trifluoracetate.

Unter den erfindungsgemäßen Verbindungen, sind solche besonders bevorzugt, worin Xxx<sup>6</sup> D-[ε-N'-(Imidazolidin-2-on-4-yl)-formyl]-Lys, D-(3-Amino-1,2,4,-triazol-3-carbonyl)-Lys, abgekürzt D-Lys(Atz) oder D-[ε-N'-4-(4-Amidino-phenyl)-amino-1,4-dioxo-butyl]-Lys, abgekürzt D-Lys(B) bedeutet.

Weitere besonders bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen sind:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>,

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(Atz)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>,

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(B)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>,

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(B)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>,

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>,

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Sar<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>,

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Sar<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>,

3-(4-Fluorphenyl)-propionyl-D-Nal(1)<sup>1</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(Atz)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>,

sowie deren Salze mit den obengenannten pharmazeutisch akzeptablen Säuren.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können zur Behandlung hormonabhängiger Tumore, insbesondere Prostatacarcinom oder Brustkrebs, sowie für nicht-maligne Indikationen, deren Behandlung eine LH-RH-Hormonsuppression erfordert, verwendet werden. Dazu werden sie mit den üblichen Träger- und Hilfsstoffen vermischt und als Arzneimittel konfektioniert.

Die Synthese von Verbindungen gemäß Formel (I) kann sowohl entweder durch klassische Fragmentkondensation oder per Festphasensynthese nach Merrifield mit aufeinander abfolgendem Aufbau unter Verwendung von in der Seitenkette bereits mit der Carbonsäure der allgemeinen Formel R<sup>1</sup>-COOH acyliertem D-Lysin als auch durch Umsetzung eines Decapeptidbausteins mit den entsprechenden Carbonsäuren durch Amid-Verknüpfung in der Seitenkette von D-Lysin<sup>6</sup> erfolgen. Demnach kann die Einführung der R<sup>1</sup>-CO-Gruppe an drei verschiedenen Stellen des Verfahrens vorgenommen werden: vor der Kondensation der Einzelbausteine zum Peptid, nach dem Einbau von Lysin oder Ornithin in der Peptidkette, aber vor der Kondensation des nächstfolgenden Bausteins oder nach Kondensation aller Bausteine.

Die Verbindungen der Formel (I) werden nach den bekannten Methoden synthetisiert, wie zum Beispiel durch reine Festphasentechnik, teilweise Festphasentechnik (sogenannte Fragmentkondensation) oder durch die

Klassischen Lösungskupplungen (siehe M.Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer Verlag 1984).

Zum Beispiel sind die Methoden der Festphasensynthese im Lehrbuch "Solid Phase Peptide Synthesis" J.M.Stewart and J.D.Young, Pierce Chem.Company, Rockford, Ill, 1984, und in G.Barany and R.B.Merrifield "The Peptides", Ch.1, S.1-285, 1979, Academic Press Inc. beschrieben. Klassische Lösungssynthesen sind ausführlich in der Behandlung "Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Synthese von Peptiden" E.Wünsch (Herausgeber) 1974, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, BRD, beschrieben.

Der stufenweise Aufbau erfolgt zum Beispiel, indem man zunächst die Carboxy-terminale Aminosäure, deren  $\alpha$ -ständige Aminogruppe geschützt ist, an einen hierfür üblichen unlöslichen Träger kovalent bindet, die  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe dieser Aminosäure abspaltet, an die so erhaltene freie Aminogruppe die nächste geschützte Aminosäure über ihre Carboxy-Gruppe bindet, und in dieser Weise Schritt für Schritt die übrigen Aminosäuren des zu synthetisierenden Peptids in der richtigen Reihenfolge verknüpft, und nach Verknüpfung aller Aminosäuren das fertige Peptid vom Träger abspaltet und gegebenenfalls weitere vorhandene Seitenfunktions-Schutzgruppen abspaltet. Die stufenweise Kondensation erfolgt durch Synthese aus den entsprechenden, in üblicher Weise geschützten Aminosäuren in herkömmlicher Weise.

Die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren miteinander erfolgt nach den hierfür üblichen Methoden, insbesondere kommen in Frage:

- Methode der symmetrischen Anhydride in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid oder Diisopropylcarbodiimid (DCC, DIC)
- Carbodiimid-Methode allgemein
- Carbodiimid-Hydroxybenzotriazol-Methode

(siehe The Peptides, Volume 2, Ed. E. Gross and J. Meienhofer).

Bei der Fragmentkupplung verwendet man vorzugsweise die ohne Racemisierung verlaufende Azidkupplung oder die DCC-1-Hydroxybenzotriazol- beziehungsweise DCC-3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin-Methode. Man kann auch aktivierte Ester von Fragmenten einsetzen.

Für die stufenweise Kondensation von Aminosäuren eignen sich besonders gut aktivierte Ester von N-geschützten Aminosäuren, wie zum Beispiel N-Hydroxysuccinimidester oder 2,4,5-Trichlorphenylester. Die Aminolyse lässt sich sehr gut durch N-Hydroxyverbindungen, die in etwa die Acidität der Essigsäure besitzen, wie zum Beispiel 1-Hydroxybenzotriazol, katalysieren.

Als intermediäre Aminoschutzgruppen bieten sich abhydrierende Gruppen, wie zum Beispiel der Benzyloxycarbonylrest (= Z-Rest) oder schwach sauer abspaltbare Gruppen an. Als Schutzgruppen für die  $\alpha$ -ständigen Aminogruppen kommen zum Beispiel in Frage:

tertiäre Butyloxycarbonylgruppen, Fluorenylmethyloxycarbonylgruppen Carbobenzoxygruppen beziehungsweise Carbobenzthiogruppen (gegebenenfalls jeweils mit p-Brom oder p-Nitro-benzylrest), die Trifluoracetylgruppe, der Phthalylrest, die o-Nitrophenoxyacetylgruppe, die Tritylgruppe, die p-Toluolsulfonylgruppe, die Benzylgruppe, im Benzolkern substituierte Benzylreste (p-Brom oder p-Nitro-benzylrest) und der  $\alpha$ -Phenylethylrest. Hierzu wird auch auf Jesse P. Greenstein und Milton Winitz, Chemistry of Amino Acids, New York 1961, John Wiley and Sons, Inc., Volume 2, beispielsweise Seite 883 und folgende, "Principles of Peptide Synthesis", Springer Verlag 1984, "Solid Phase Peptide Synthesis" J.M. Stewart and J.D. Young, Pierce Chem. Company, Röckford, III, 1984; G. Bárany and R.B. Merrifield "The Peptides", Ch.1, S.1-285, 1979, Academic Press Inc. sowie The Peptides, Volume 2, Ed. E. Gross and J. Maienhofer, Academic Press, New York, verwiesen. Diese Schutzgruppen kommen grundsätzlich auch für den

Schutz von weiteren funktionellen Seitengruppen (OH-Gruppen, NH<sub>2</sub>-Gruppen) der entsprechenden Aminosäuren in Frage.

Vorhandene Hydroxygruppen (Serin, Threonin) werden vorzugsweise durch Benzylgruppen und ähnliche Gruppen geschützt. Weitere nicht  $\alpha$ -ständige Aminogruppen (zum Beispiel Aminogruppen in  $\omega$ -Stellung, Guanidinogruppe des Arginins) werden vorzugsweise orthogonal geschützt.

Die einzelnen Aminosäurebausteine sind, ausgenommen durch die R<sup>1</sup>-CO-Gruppe modifiziertes Lysin oder Ornithin, käuflich erhältlich. Ein möglicher Ablauf des Verfahrens zur Herstellung der letzteren Verbindungen ist wie folgt:

1. Die  $\alpha$ -Carbonsäuregruppe wird amidiert.
2. Die  $\varepsilon$ -Aminogruppe wird mit der Z-Gruppe geschützt.
3. Die  $\alpha$ -Aminogruppe wird mit der Boc-Gruppe geschützt, so daß sich eine Selektivität bezüglich der späteren Abspaltung der Aminoschutzgruppen ergibt.
4. Die Z-Gruppe an der  $\varepsilon$ -Aminogruppe wird abgespalten.
5. An der  $\varepsilon$ -Aminogruppe wird die gewünschte Gruppe R<sup>4</sup>-CO- eingeführt.
6. Die Boc-Gruppe an der  $\alpha$ -Aminogruppe wird abgespalten.
7. Die  $\alpha$ -Aminogruppe wird mit der Z-Gruppe versehen.

Für die Einführung der R<sup>1</sup>-CO-Gruppe durch Umsetzen der Aminogruppe des Lysins mit der entsprechenden Carbonsäure kommen grundsätzlich die gleichen Vefahren wie oben für die Verknüpfung der Aminosäuren beschriebenen in Frage. Besonders bevorzugt ist jedoch die Kondensation unter Verwendung von Carbodiimid, beispielsweise 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, und 1-Hydroxybenzotriazol.

Die Reaktion zur Verknüpfung vom Aminosäuren findet in einem hierfür üblichen indifferenten Lösungs- oder Suspensionsmittel (zum Beispiel Dichlormethan) statt, wobei gegebenenfalls zur Verbesserung der Löslichkeit Dimethylformamid zugesetzt werden kann.

Als synthetisches Trägermaterial kommen unlösliche Polymere in Frage, zum Beispiel in organischen Lösungsmittel quellbares Polystyrolharz in Perlenform (beispielsweise ein Copolymerisat aus Polystyrol und 1% Divinylbenzol). Der Aufbau eines geschützten Decapeptidamids an einem Methyl-benzhydrylamid-Harz (MBHA-Harz, d.h. mit Methyl-benzhydrylamid-Gruppen versehenes Polystyrolharz), welches die gewünschte C-terminale Amidfunktion des Peptids nach HF-Spaltung vom Träger ergibt, kann gemäß folgendem Fließdiagramm durchgeführt werden:

#### Fließdiagramm

#### Peptid-Syntheseprotokoll

Stufe	Funktion	Lösungsmittel/Reagenz (v/v)	Zeit
1	Waschen	Methanol	2 x 2 min
2	Waschen	DCM	3 x 3 min
3	Abspaltung	DCM/TFA (1:1)	1 x 30 min
4	Waschen	Isopropanol	2 x 2 min
5	Waschen	Methanol	2 x 2 min
6	Waschen	DCM	2 x 3 min
7	Neutralisation	DCM/DIPEA (9:1)	3 x 5 min
8	Waschen	Methanol	2 x 2 min
9	Waschen	DCM	3 x 3 min
10	STOP	Zugabe der Boc-As in DCM + DIC + HOBt	
11	Kupplung	DCM, ggf. DCM/DCF	ca. 90 min
12	Waschen	Methanol	3 x 2 min
13	Waschen	DCM	2 x 3 min

Die  $\text{N}^{\alpha}$ -Boc-geschützten Aminosäuren werden üblicherweise in dreifachem molaren Überschuß in Gegenwart von Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-

Hydroxybenzotriazol (HOBT) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /DMF innerhalb von 90 min. gekuppelt, und die Boc-Schutzgruppe durch halbstündige Einwirkung von 50% Trifluoressigsäure (TFA) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  abgespalten. Zur Kontrolle des vollständigen Umsatzes kann der Chloraniltest nach Christensen und der Kaiser'sche Ninhydrin-Test dienen. Reste freier Aminofunktion werden durch Acetylierung in fünffachem Überschuß an Acetylimidazol in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  blockiert. Die Abfolge der Reaktionsschritte des Peptidaufbaus am Harz ergibt sich aus dem Fließdiagramm. Zur Abspaltung der harzgebundenen Peptide wird das jeweilige Endprodukt der Festphasensynthese im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet und in 500fachem Überschuß an HF/Anisol 10:1/V:V 60 min. bei 0°C behandelt.

Nach Abdestillation von HF und Anisol im Vakuum fallen die Peptidamide durch Ausröhren mit wasserfreiem Ethylether als weiße Feststoffe an, die Abtrennung von mit anfallendem polymeren Träger erfolgt durch Auswaschen mit 50%iger wäßriger Essigsäure. Durch schonendes Einengen der essigsauren Lösungen im Vakuum können die jeweiligen Peptide als hochviskose Öle erhalten werden, welche sich nach Zugabe von abs. Ether in der Kälte in weiße Feststoffe umwandeln.

Die weitere Aufreinigung erfolgt durch Routinemethoden der präparativen Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).

Das Überführen der Peptide in ihre Säureadditionssalze kann durch Umsetzen derselben mit Säuren in an sich bekannter Weise bewerkstelligt werden. Umgekehrt können freie Peptide durch Umsetzen ihrer Säureadditionssalze mit Basen erhalten werden. Peptidembonate können durch Umsetzung von Trifluoressigsäuresalzen (TFA-Salzen) des Peptids mit freier Embonsäure (Pamoasäure) oder dem entsprechenden Dinatrium-Salz der Embonsäure dargestellt werden. Dazu wird das Peptid-TFA-Salz in wäßriger Lösung mit der Lösung von Dinatrium-embonat in polar-aprotischem Medium, bevorzugt

Dimethylacetamid, versetzt und der sich bildende hellgelbe Niederschlag isoliert.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung, ohne diese zu beschränken.

#### Beispiel 1

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte gemäß Festphasen-Fließdiagramm (Peptidsynthese-Protokoll, S. 11) mit DIC/HOBt-Kupplung, ausgehend von 3.3 g MBHA-Harz (Beladungsdichte 1.08 mmol/g). Nach HF-Abspaltung vom polymeren Träger fielen 3.4 g Rohpeptid an, welches durch Standardverfahren der präparativen HPCI aufgereinigt wurden. Nach anschließender Gefriertrocknung erhielt man 1.43 g HPLC-einheitliches Produkt der Summenformel C72, H96, N17, O14, Cl mit korrektem FAB-MS: 1458.7 (M+H<sup>+</sup>) (ber: 1457.7), und entsprechendem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O/DMSO-d<sub>6</sub>, δ in ppm):

8,7 bis 7,2, mehrere m, arom. H und nicht vollständig ausgetauschte NH; 6,92 u. 6,58, 2d, 2x2H, arom. H p-Cl-Phe; 5,2 bis 3,5, mehrere m, Cα-H u. aliph. H; 3,2 bis 2,6, mehrere m, aromat. Cβ-H, 2,1 bis 0,7, mehrere m, restl. aliphat. H; 1,70, s, 3H, Acetyl; 1,20, d, 3H, Cβ-H Ala; 0,8, m, Cδ-H Leu

#### Beispiel 2

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(B)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte gemäß Fließdiagramm (Peptidsynthese-Protokoll, S. 11) mit DIC/HOBt-Kupplung, ausgehend von 4.0 g MBHA-Harz (Beladungsdichte 1.11 mmol/g). Nach HF-Abspaltung vom polymeren Träger fielen 4.87 g Rohpeptid an, welches durch Standardverfahren der präparativen HPCI aufgereinigt wurden. Nach anschließender Gefriertrocknung erhielt man 0.93 g HPLC-einheitliches Produkt, welches mit 4-Amidinophenylamino-4-oxobuttersäure in Gegenwart von BOP als Kupplungsreagenz zur gewünschten Verbindung umgesetzt wurde. Nach erneuter HPLC-Aufreinigung erhielt man 148 mg Zielverbindung der Summenformel C85, H112, N17, O15, Cl mit korrektem ESI-MS: 1647.6 (M+H<sup>+</sup>), (ber: 1645.8), und entsprechendem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ in ppm):

10.4, s, 1H u. 9.13, s, 2H, u. 8.94, s, 2H, NH's von 4-Amidinoanilin; 8.6 bis 7.35, mehrere m, arom.H und NH; 7.22 und 7.18, 2d, 4H, arom.H (pCl)Phe; 6.95 u. 6.58, 2d, 4H, arom.H Tyr; 5.2 bis 3.5, mehrere m, C<sub>α</sub>-H und aliphat H; 3.3 bis 2.4, mehrere m, C<sub>β</sub>-H, und N-CH<sub>3</sub>, 2.1 bis 1.1, mehrere m, restl. aliphat H, 1.68, s, 3H, Acetyl; 1.20, d, 3H, C<sub>β</sub>-H Ala; 0.83, dd, 6H, C<sub>δ</sub>-H Leu

### Beispiel 3

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(B)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte gemäß Festphasen-Fließdiagramm (Peptidsynthese-Protokoll, S. 11) mit DIC/HOBt-Kupplung, ausgehend von 4.0 g MBHA-Harz (Beladungsdichte 0.97 mmol/g). Nach HF-Abspaltung vom polymeren Träger fielen 4.0 g Rohpeptid an, welches durch Standardverfahren der präparativen HPCI aufgereinigt wurden. Nach anschließender Gefriertrocknung erhielt man 1.39 g HPLC-einheitliches Produkt, welches mit 4-Amidinophenylamino-4-oxobuttersäure in Gegenwart von BOP als Kupplungsreagenz zur gewünschten

Verbindung umgesetzt wurde. Nach erneuter HPLC-Aufreinigung erhielt man 440 mg Zielverbindung der Summenformel C82, H106, N19, O15, Cl mit korrektem ESI-MS: 1632.7 (M+H<sup>+</sup>) (ber: 1631.7) und entsprechendem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ in ppm):

10,4, s, 1H u. 9,15, s, 2H, u. 9,0, s, 2H, NH's von 4-Amidinoanilin; 8,60, m, 2H, arom. H; 8,3 bis 7,2, mehrere m, arom. H und NH; 7,27 und 7,20, 2d, 4H, arom. H (pCl)Phe; 6,96 u. 6,60, 2d, 4H, arom. H Tyr; 5,2 bis 3,5, mehrere m, C<sub>α</sub>-H und aliphat H; 3,2 bis 2,4, mehrere m, C<sub>β</sub>-H, und N-CH<sub>3</sub>, 2,1 bis 1,1, mehrere m, restl. aliphat H, 1,70, s, 3H, Acetyl; 1,20, d, 3H, C<sub>β</sub>-H Ala; 0,85, dd, 6H, C<sub>δ</sub>-H Leu

#### Beispiel 4

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte gemäß Festphasen-Fließdiagramm (Peptidsynthese-Protokoll, S. 11) mit DIC/HOBt-Kupplung, ausgehend von 2.5 g MBHA-Harz (Beladungsdichte 1.08 mmol/g). Nach HF-Abspaltung vom polymeren Träger fielen 2.78 g Rohpeptid an, welches durch Standardverfahren der präparativen HPCI aufgereinigt wurden. Nach anschließender Gefriertrocknung erhielt man 400 mg HPLC-einheitliches Produkt der Summenformel C75, H102, N15, O14, Cl mit korrektem ESI-MS: 1472.6 (M+H<sup>+</sup>) (ber: 1471.7) und entsprechendem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O/DMSO-d<sub>6</sub>, δ in ppm):

8,62, m, 2H, 8,30, m, 2H, 7,80, m, 4H, 7,66, s, 1H, 7,47, m, 2H, 7,36, d, 1H, aromat. H; 7,25 und 7,20, 2d, 4H, arom. H (pCl)Phe; 6,96 und 6,63, 2d, 4H, aromat. H Tyr; 5,10 bis 4,0, mehrere m, C<sub>α</sub>-H und aliphat H; 3,75 bis 2,65,

mehrere m, C $\beta$ -H und N-CH<sub>3</sub>; 2.1 bis 1.05, mehrere m, restl. aliphat H; 1.74, s, 3H, Acetyl; 1.23, d, 3H, C $\beta$ -H Ala; 1.20, m, CH<sub>3</sub> Isoprop.; 0.8, m, 3H, C $\delta$ -H Nle

Beispiel 5

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Sar<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte gemäß Festphasen-Fließdiagramm (Peptidsynthese-Protokoll, S. 11) mit DIC/HOBt-Kupplung, ausgehend von 2.5 g MBHA-Harz (Beladungsdichte 1.08 mmol/g). Nach HF-Abspaltung vom polymeren Träger fielen 2.74 g Rohpeptid an, welches durch Standardverfahren der präparativen HPCI aufgereinigt wurden. Nach anschließender Gefriertrocknung erhielt man 840 mg HPLC-einheitliches Produkt der Summenformel C75, H102, N15, O14, Cl mit korrektem ESI-MS: 1472.6 (M+H<sup>+</sup>) (ber: 1471.7) und entsprechendem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O/DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  in ppm):

8.6, m, 2H, 8.3, m, 2H, 7.85, m, 2H, 7.8, m, 2H, 7.65, s, 1H, 7.46, m, 2H, 7.35, d, 1H, aromat. H; 7.23 und 7.17, 2 d, 4H, arom.H (pCl)Phe; 7.0 und 6.6, 2 d, 4H, aromat. H Tyr; 5.10 bis 3.8, mehrere m, C $\alpha$ -H und aliphat H; 3.75 bis 2.6, mehrere m, C $\beta$ -H und N-CH<sub>3</sub>; 2.2 bis 1.05, mehrere m, restl. aliphat H; 1.70, s, 3H, Acetyl; 1.23, d, 3H, C $\beta$  Ala; 1.20, m, CH<sub>3</sub> Isoprop.; 0.8, m, 3H, C $\delta$  Nle

Beispiel 6

3-(4-Fluorphenyl)-propionyl-D-Nal(1)<sup>1</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(Atz)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>

Die Synthese erfolgte gemäß Festphasen-Fließdiagramm (Peptidsynthese-Protokoll, S. 11) mit DIC/HOBt-Kupplung, ausgehend von 9.2 g MBHA-Harz

(Beladungsdichte 1.08 mmol/g). Nach HF-Abspaltung vom polymeren Träger fielen 5.8 g Rohpeptid an, welches durch Standardverfahren der präparativen HPCI aufgereinigt wurden. Nach anschließender Gefriertrocknung erhielt man 2.0 g HPLC-einheitliches unsubstituiertes Octapeptid, von welchem 0.4 mmol mit 0.5 mmol 3-Amino-1,2,4-triazol-5-carbonsäure in Gegenwart von PyBOP als Kupplungsreagenz zu 790 mg Rohprodukt der gewünschten Verbindung umgesetzt wurde. Nach erneuter HPLC-Aufreinigung erhielt man 200 mg Zielverbindung der Summenformel C64, H86, N17, O12, F mit korrektem FAB-MS: 1304.6 (M+H<sup>+</sup>), (ber: 1303.6).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O/DMSO-d<sub>6</sub>, δ in ppm):

8.14, m, 1H, 7.90, m, 1H, 7.80, m, 1H, 7.50, m, 2H, 7.35, m, 2H, 7.0, m, 6H, 7.63, m, 2H, aromat. H; 5.0, m, 1H, 4.83, m, 2H, 4.41, m, 1H, 4.30 - 4.05, mehrere m, 4H, C<sub>α</sub>-H; 3.66 bis 2.25, mehrere m, aliphat. und aromat. Seitenketten-H; 2.95, s, u. 2.75, s, N-Me; 2.05 bis 1.1, mehrere m, restl. aliphat. H; 1.20, d, C<sub>β</sub>-H Ala; 0.75, m, 6H, C<sub>δ</sub>-H Leu

Die erfindungsgemäßen Verbindungen nach Formel I wurden auf ihre Rezeptorbindung untersucht. Das Verfahren lehnte sich eng an das in Beckers et al., Eur. J. Biochem. 231, 535-543 (1995), beschriebene Verfahren an. Nach der oben offenbarten Synthese erhaltenes Cetrorelix wurde mit [<sup>125</sup>I] (Amersham; spezifische Aktivität 80.5Bq/fmol) unter Verwendung des IodoGen-Reagens (Pierce) iodiert. Das Reaktionsgemisch wurde durch Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gereinigt, wobei mono-iodiertes Cetrorelix ohne unmarkiertes Peptid erhalten wurde. Jeweils etwa 80% des [<sup>125</sup>I]-Cetrorelix und der nicht markierten erfindungsgemäßen Verbindung waren zur spezifischen Rezeptorassoziation geeignet.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können mit den folgenden Methoden 1 und 2 auf ihre In-vitro-Wirkung getestet werden, wobei die Bindungsaffinitäten im Bindungsassay mit [<sup>125</sup>I]-Cetrorelix (Methode 1) und die funktionalen

Aktivitäten mit Triptorelin als agonistischem Stimulus (Methode 2) bestimmt wurden.

Methode 1.

Rezeptorbindungs-Assay nach Beckers, T., Marheineke, K., Reiländer, H., Hilgard P. (1995) "Selection and characterization of mammalian cell lines with stable overexpression of human pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH)" Eur. J. Biochem. 231, 535 - 543.

Zur Untersuchung der Rezeptorbindung wurde Cetrorelix unter Verwendung des IodoGen-Reagens (Pierce) mit [<sup>125</sup>I] (Amersham; 80.5Bq/fmol spezifische Aktivität) iodiert. Das Reaktionsgemisch wurde durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit vertauschten Phasen gereinigt, wobei mono-iodiertes Cetrorelix ohne unmarkiertes Peptid erhalten wurde. Etwa 80% des [<sup>125</sup>I] Cetrorelix war zur spezifischen Rezeptorassoziation befähigt.

Der Rezeptorbindungs-Assay wurde mit intakten Zellen unter physiologischen Bedingungen wie beschrieben (Beckers et al. 1995) durchgeführt.

Subkonfluente Kulturen von stabil transfizierten LTK<sup>-</sup>-Zellen, die den humanen LHRH-Rezeptor exprimieren, wurden durch Inkubation in NaCl/P<sub>i</sub> (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)/ 1mM EDTA abgetrennt und durch Zentrifugieren gesammelt. Das Zellpellet wurde in Bindungspuffer (DMEM ohne H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, mit 4.5g/l glucose, 10mM Hepes pH7.5, 0.5% (Masse/Volumen) BSA, 1g/l Bacitracin, 0.1g/l SBTI, 0.1% (Masse/Volumen) Na<sub>3</sub>N) resuspendiert. Für Verdrängungs-Assays wurden 0.25x10<sup>6</sup> Zellen/100µl mit etwa 225pM des [<sup>125</sup>I]-Cetrorelix (spezifische Aktivität 5 - 10 x10<sup>5</sup> dpm/pmol) und verschiedenen Konzentrationen von unmarkierter erfindungsgemäßer Verbindung als Kompetitor inkubiert. Die Zellsuspension in 100µl Bindungsmedium wurde in 400µl Assayrörchen über 200µl 84 Vol.-% Siliconöl (Merck Typ 550) / 16 Vol.-% Paraffinöl geschichtet. Nach Inkubation für 1h bei

37°C unter langsamem, kontinuierlichem Schütteln wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 2min bei 9000rpm (Rotortyp HTA13.8; Heraeus Sepatec, Osterode/Germany) von dem Inkubationsmedium getrennt. Die Spitzen der Röhrchen, die das Zellpellet enthielten, wurden abgeschnitten. Zellpellet und Überstand wurden anschließend durch Zählung der  $\gamma$ -Strahlung analysiert. Die Menge an unspezifisch gebundenem wurde unter Einschluß von unmarkiertem Cetrorelix bei 1 $\mu$ M Endkonzentration bestimmt und betrug typischerweise  $\leq 10\%$  des gesamten gebundenen. Die Analyse der Bindungsdaten wurde mit dem EBDA/Ligand-Analyseprogramm (Biosoft V3.0) durchgeführt.

#### Methode 2.

#### Funktioneller Assay zur Bestimmung der antagonistischen Wirksamkeit

Der Assay wurde mit einigen Modifizierungen versehen so durchgeführt wie in Beckers, T., Reiländer, H., Hilgard, P. (1997) „Characterization of gonadotropin-releasing hormone analogs based on a sensitive cellular luciferase reporter gene assay“, *Analyt. Biochem.* 251, 17 - 23 (Beckers et al. 1997) beschrieben. 10.000 Zellen pro Vertiefung, die den humanen LHRH-Rezeptor und ein Luciferase-Reportergen exprimieren, wurden 24h in Mikrotiterplatten unter Verwendung von DMEM mit Zusätzen und 1 % (v:v) FCS kultiviert. Die Zellen wurden anschließend 6h mit 1 nM [D-Trp<sup>6</sup>] LHRH stimuliert. Antagonistische erfindungsgemäße Verbindungen wurden vor der Stimulierung zugegeben und die Zellen wurden zum Schluß zur Quantifizierung der zellulären Luc-Aktivität lysiert. Die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte aus Dosis-Wirkungs-Kurven wurde durch nicht-lineare Regressionsanalyse unter Verwendung des Hill-Modells (Programm EDX 2.0 von C. Grunwald, Arzneimittelwerk Dresden) durchgeführt.

Die Quantifizierung der Luc-Aktivität wurde im wesentlichen wie beschrieben (Promega Technical Bulletins #101/161) unter Verwendung des jeweiligen

Luciferase-Assaysystems (Promega E4030) in Duplikaten durchgeführt. Durch Zugabe von Coenzyme A (CoA) findet eine Oxidation von Luciferyl-CoA mit vorteilhafter Kinetik statt. Nach der Entfernung des Kulturmediums von der Mikrotiterplatte wurden die Zellen durch Zugabe von 100µl Lysepuffer (25mM Tris-phosphate pH7.8, 2mM Dithiothreitol, 2mM 1,2-diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetra-essigsäure (CDTA), 10% (v:v) Glycerin, 1% (v:v) Triton X-100) lysiert. Nach 15min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10µl Zelllysat in eine für luminometrische Detektion geeignete weiße Mikrotiterplatte (Dynatech) überführt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50µl Assaypuffer (20mM Tricin pH7.8, 1.07mM  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg(OH)}_2$ , 2.67mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1mM Ethylenediamin-tetraessigsäure (EDTA), 33.3mM Dithiothreitol, 270µM Coenzym A, 470µM Glühwürmchen(*Photinus pyralis*)-Luciferin, 530µM rATPNa<sub>2</sub>) initiiert. Nach einer Minute wurde für eine Gesamtzeit von einer Sekunde die Lumineszenz mit einer Signalhalbwertszeit von fünf Minuten unter Verwendung des EG&G Berthold MicroLumat LB 96 P bestimmt.

Auf diese Weise wurden folgende In-vitro-Daten erhalten, wobei K<sub>D</sub> für die Bindungsaffinitäten und IC<sub>50</sub> für die funktionale Aktivität steht und pM Pikomol pro Liter bedeutet:

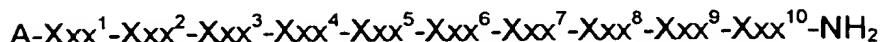
Verbindung	K <sub>D</sub> [pM]	IC <sub>50</sub> [pM]
Cetrorelix	170 (21)	198 (5)
Beispiel 1 (Acetat Salz)	n. b.	242 (3)
Beispiel 2	181 (1)	684 (2)
Beispiel 3	154 (1)	492 (2)
Beispiel 6	n. b.	221 (2)

n. b. = nicht bestimmt

( ) = Anzahl der voneinander unabhängigen Versuche

## Patentansprüche

## 1. Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

A eine Acetyl- oder eine 3-(4-Fluorphenyl)-propionyl-Gruppe,

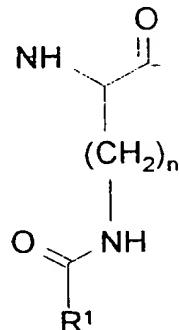
Xxx<sup>1</sup> D-Nal(1) oder D-Nal(2),

Xxx<sup>2</sup>-Xxx<sup>3</sup> D-Cpa-D-Pal(3) oder eine Einfachbindung,

Xxx<sup>4</sup> Ser,

Xxx<sup>5</sup> N-Me-Tyr,

Xxx<sup>6</sup> D-Cit, D-Hci oder eine D-Aminosäuregruppe der allgemeinen Formel (II)

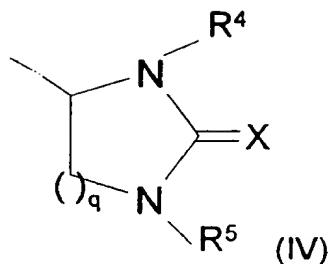


(II)

in der n die Zahl 3 oder 4 bedeutet, darstellt, wobei R<sup>1</sup> eine Gruppe mit der allgemeinen Formel III,



worin p eine ganze Zahl von 1 bis 4, R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Alkylgruppe und R<sup>3</sup> eine unsubstituierte oder substituierte Arylgruppe oder Heteroarylgruppe bedeutet, oder R<sup>1</sup> eine 3-Amino-1,2,4-triazol-5-carbonyl-Gruppe oder R<sup>1</sup> einen Ring der allgemeinen Formel (IV)



in dem q die Zahl 1 oder 2, R<sup>4</sup> ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe, R<sup>5</sup> ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe und X ein Sauerstoff- oder Schwefelatom bedeutet, darstellt,

Xxx<sup>7</sup> Leu oder Nle,

Xxx<sup>8</sup> Arg oder Lys(iPr),

Xxx<sup>9</sup> Pro und

Xxx<sup>10</sup> Ala oder Sar bedeutet,

und deren Salze mit pharmazeutisch akzeptablen Säuren.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, worin das Salz ein Acetat, Trifluoracetat, oder Embonat ist.

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, worin Xxx<sup>6</sup> D-[ε-N'-(Imidazolidin-2-on-4-yl)-formyl]-Lys, D-(3-Amino-1,2,4,-triazol-3-carbonyl)-Lys, abgekürzt D-Lys(Atz), oder D-[ε-N'-4-(4-Amidino-phenyl)-amino-1,4-dioxo-butyl]-Lys, abgekürzt D-Lys(B), bedeutet.

4. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>.

5. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(Atz)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>.

6. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(B)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>.

7. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(B)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>.

8. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>.

9. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Lys(iPr)<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Sar<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>.

10. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel:

Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>-D-Cpa<sup>2</sup>-D-Pal(3)<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Hci<sup>6</sup>-Nle<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Sar<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>.

11. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel:

3-(4-Fluorphenyl)-propionyl-D-Nal(1)<sup>1</sup>-Ser<sup>4</sup>-N-Me-Tyr<sup>5</sup>-D-Lys(Atz)<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-D-Ala<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11.

13. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1, bei dem Fragmente aus mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx<sup>m</sup>, bei denen m eine ganze Zahl von 1 bis 10 bedeutet und Xxx<sup>1</sup> acetyliert ist, an einer Festphase oder in Lösung nach üblichen Verfahren aufgebaut werden, anschließend die Fragmente an einer

Festphase durch Segmentkupplung verbunden werden und nach Abschluß der Kupplung die Verbindungen der allgemeinen Formel I mit üblichen Verfahren unter Amidierung am Baustein Xxx<sup>10</sup> von der Festphase abgespalten werden.

14. Verwendung der Substanzen gemäß den Ansprüchen 1 bis 11 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung hormonabhängiger Tumore, insbesondere Prostatacarcinom oder Brustkrebs, sowie für nicht-maligne Indikationen, deren Behandlung eine LH-RH-Hormonsuppression erfordert.

15. Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln, bei dem man Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 11 mit den üblichen Träger- und Hilfsstoffen vermischt und als Arzneimittel konfektioniert.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/02165A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07K7/23 A61K38/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 19953 A (KUTSCHER BERNHARD ;BERND MICHAEL (DE); ASTA MEDICA AG (DE); BECKER) 5 June 1997 (1997-06-05) cited in the application claims 1,6 ---	1-15
Y	EP 0 328 090 A (ABBOTT LAB) 16 August 1989 (1989-08-16) claim 1; example 36 ---	1-15
Y	EP 0 413 209 A (ABBOTT LAB) 20 February 1991 (1991-02-20) cited in the application page 12, line 40,41; example 121 -----	1-15

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

16 June 2000

23/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Deffner, C-A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/02165

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9719953	A 05-06-1997	DE 19544212 A		05-06-1997
		AU 706546 B		17-06-1999
		AU 1867097 A		19-06-1997
		BG 102514 A		30-04-1999
		BR 9611760 A		05-10-1999
		CA 2238570 A		05-06-1997
		CN 1202882 A		23-12-1998
		CZ 9801358 A		16-09-1998
		EP 0876337 A		11-11-1998
		HU 9901656 A		30-08-1999
		JP 2000501083 T		02-02-2000
		NO 982366 A		25-05-1998
		NZ 330521 A		28-01-1999
		PL 326977 A		09-11-1998
		SK 62998 A		12-07-1999
		US 5942493 A		24-08-1999
EP 0328090	A 16-08-1989	DE 68928278 D		02-10-1997
		DE 68928278 T		12-03-1998
		EP 0400065 A		05-12-1990
		ES 2108684 T		01-01-1998
		GR 3025403 T		27-02-1998
		MX 9202974 A		01-07-1992
		WO 8907450 A		24-08-1989
		US 5300492 A		05-04-1994
EP 0413209	A 20-02-1991	US 5110904 A		05-05-1992
		AU 672474 B		03-10-1996
		AU 5789294 A		26-05-1994
		AU 6028690 A		07-02-1991
		CA 2022444 A		08-02-1991
		HU 54387 A		28-02-1991
		JP 3101695 A		26-04-1991
		MX 9202974 A		01-07-1992
		NO 903455 A		08-02-1991
		PL 286388 A		06-05-1991
		PT 94924 A, B		22-05-1991
		US 5300492 A		05-04-1994

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

tionales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/02165

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07K7/23 A61K38/09

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 97 19953 A (KUTSCHER BERNHARD ; BERND MICHAEL (DE); ASTA MEDICA AG (DE); BECKER) 5. Juni 1997 (1997-06-05) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,6 ---	1-15
Y	EP 0 328 090 A (ABBOTT LAB) 16. August 1989 (1989-08-16) Anspruch 1; Beispiel 36 ---	1-15
Y	EP 0 413 209 A (ABBOTT LAB) 20. Februar 1991 (1991-02-20) in der Anmeldung erwähnt Seite 12, Zeile 40,41; Beispiel 121 -----	1-15

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>a</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"V" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16. Juni 2000

23/06/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Deffner, C-A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ionales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/02165

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9719953	A 05-06-1997	DE 19544212 A		05-06-1997
		AU 706546 B		17-06-1999
		AU 1867097 A		19-06-1997
		BG 102514 A		30-04-1999
		BR 9611760 A		05-10-1999
		CA 2238570 A		05-06-1997
		CN 1202882 A		23-12-1998
		CZ 9801358 A		16-09-1998
		EP 0876337 A		11-11-1998
		HU 9901656 A		30-08-1999
		JP 2000501083 T		02-02-2000
		NO 982366 A		25-05-1998
		NZ 330521 A		28-01-1999
		PL 326977 A		09-11-1998
		SK 62998 A		12-07-1999
		US 5942493 A		24-08-1999
EP 0328090	A 16-08-1989	DE 68928278 D		02-10-1997
		DE 68928278 T		12-03-1998
		EP 0400065 A		05-12-1990
		ES 2108684 T		01-01-1998
		GR 3025403 T		27-02-1998
		MX 9202974 A		01-07-1992
		WO 8907450 A		24-08-1989
		US 5300492 A		05-04-1994
EP 0413209	A 20-02-1991	US 5110904 A		05-05-1992
		AU 672474 B		03-10-1996
		AU 5789294 A		26-05-1994
		AU 6028690 A		07-02-1991
		CA 2022444 A		08-02-1991
		HU 54387 A		28-02-1991
		JP 3101695 A		26-04-1991
		MX 9202974 A		01-07-1992
		NO 903455 A		08-02-1991
		PL 286388 A		06-05-1991
		PT 94924 A, B		22-05-1991
		US 5300492 A		05-04-1994